

Attorney Docket No. 01697/LH

**IN THE UNITED STATES PATENT
AND TRADEMARK OFFICE**

Applicant(s): H. SASAKI, ET AL

Serial No. : 10/006,373

Filed : October 29, 2001

For : LASER MICROSCOPE

Art Unit : 2872

Examiner :

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT(S)

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

S I R :

Enclosed are:

Certified copy(ies); priority is claimed under 35 USC

119:

Country

Application No.

Filing Date:

JAPAN

2000-333782

October 31, 2000

Respectfully submitted,

Leonard Holtz, Esq.
Reg. No. 22,974

February 11, 2002

Frishauf, Holtz, Goodman, Langer & Chick, P.C.
767 Third Avenue - 25th Floor
New York, New York 10017-2023
Tel. No. (212) 319-4900
Fax No. (212) 319-5101
LH:sp

CERTIFICATE OF MAILING

I hereby certify this
correspondence is being
deposited with the United
States Postal Service as First
Class mail with sufficient
postage in an envelope
addressed to: Assistant
Commissioner of Patents,
Washington, D.C. 20231 on the
date noted below.

Attorney: Leonard Holtz

Dated: February 11, 2002

In the event that this Paper
is late filed, and the
necessary petition for
extension of time is not filed
concurrently herewith, please
consider this as a Petition
for the requisite extension of
time, and to the extent not
tendered by check attached
hereto, authorization to
charge the extension fee,
or any other fee required
in connection with this
Paper, to Account No. 06-1378.



日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

10/006373
01697/LH

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2000年10月31日

出願番号

Application Number:

特願2000-333782

出願人

Applicant(s):

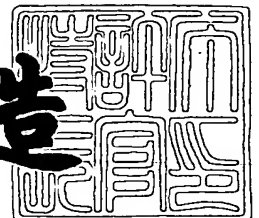
オリンパス光学工業株式会社

COPY OF PAPERS
ORIGINALLY FILED

2001年10月 3日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3090432

【書類名】 特許願

【整理番号】 A000006337

【提出日】 平成12年10月31日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G02B 21/00

【発明の名称】 レーザ顕微鏡

【請求項の数】 5

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号 オリンパス光学工業株式会社内

 【氏名】 佐々木 浩

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号 オリンパス光学工業株式会社内

 【氏名】 島田 佳弘

【特許出願人】

 【識別番号】 000000376

 【氏名又は名称】 オリンパス光学工業株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100058479

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 鈴江 武彦

 【電話番号】 03-3502-3181

【選任した代理人】

 【識別番号】 100084618

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 村松 貞男

【選任した代理人】

 【識別番号】 100068814

【弁理士】

【氏名又は名称】 坪井 淳

【選任した代理人】

【識別番号】 100091351

【弁理士】

【氏名又は名称】 河野 哲

【選任した代理人】

【識別番号】 100100952

【弁理士】

【氏名又は名称】 風間 鉄也

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011567

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0010297

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 レーザ顕微鏡

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 複数の発振波長からなるレーザ光を対物レンズを通して標本に照射し、この標本からの蛍光を検出するレーザ顕微鏡において、

複数の発振波長からなる前記レーザ光をスペクトル分解するスペクトル分解手段と、

このスペクトル分解手段によりスペクトル分解されたレーザ光を受光する受光素子列と、

この受光素子列の出力信号を受けて前記レーザ光を前記発振波長ごとに制御する制御手段と、

を具備したことを特徴とするレーザ顕微鏡。

【請求項 2】 前記スペクトル分解手段は、プリズム、回折光子、又はビームスプリッタであることを特徴とする請求項 1 記載のレーザ顕微鏡。

【請求項 3】 前記受光素子列は、分割フォトダイオード、又は固体撮像素子であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載のレーザ顕微鏡。

【請求項 4】 複数の発振波長からなる前記レーザ光をレーザ顕微鏡本体に導く光ファイバーを設けたことを特徴とする請求項 1、2 又は 3 記載のレーザ顕微鏡。

【請求項 5】 前記レーザ光をコリメートするコリメータレンズと、このコリメータレンズによりコリメートされた前記レーザ光の一部を分離するビームスプリッタと、このビームスプリッタにより分離された前記レーザ光をスペクトル分解するスペクトル分解手段と、このスペクトル分解手段によりスペクトル分解されたレーザ光を集光する集光レンズと、この集光レンズにより集光されたレーザ光を受光する受光素子列とを 1 つにブロック化し、レーザ顕微鏡本体に対して着脱自在に構成したことを特徴とする請求項 4 項記載のレーザ顕微鏡。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、特に生物学や医学等の用途に用いられるもので、複数の発振波長からなるレーザ光を対物レンズを通して標本に照射し、この標本からの蛍光を検出するレーザ顕微鏡に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

生物学や医学等の用途に用いられるレーザ顕微鏡では、例えば細胞や組織を生きのまま長時間にわたって観察することが要求される。例えば細胞や組織内のカルシウム濃度の変化を観察する場合には、カルシウム濃度に応じた蛍光を発する蛍光指示薬で標本を染色し、この蛍光指示薬に適する波長のレーザ光（励起光）を標本に照射し、この標本からの蛍光を検出する。この場合、一般的に細胞や組織からのシグナル（蛍光）の変化は極めて小さいので、標本に照射するレーザ光の強度は長時間にわたって高い精度で安定していることが要求される。

【 0 0 0 3 】

標本に照射するレーザ光の強度が安定しない原因としてはいくつか考えられる。一般的なヘリウムネオンレーザでは、発振出力をモニターして、これをフィードバックして制御することは行われておらず、このために環境温度の変化等によりその発振出力は変動する。

【 0 0 0 4 】

又、多波長発振、例えば 4 8 8 n m、5 1 4 . 5 n m の波長のレーザ光で発振するアルゴンレーザには、発振出力をモニターして、フィードバック制御するものがある。しかし、波長 4 8 8 n m、5 1 4 . 5 n m のアルゴンレーザ光の総合出力をモニターしているので、各ラインの出力は発振モード（波長 4 8 8 n m、5 1 4 . 5 n m）の間で競合し、このために各発振波長は変動してしまう。さらに、アルゴンガスの消費により波長 4 8 8 n m、5 1 4 . 5 n m のアルゴンレーザ光の発振出力の強度比が使用時間とともに変化する。

【 0 0 0 5 】

一方、レーザ光を光ファイバーに導入してレーザ顕微鏡本体に導光するようなレーザ顕微鏡では、環境温度の変化により光ファイバーによる出力変動や、構成要素の熱変形による導光効率の変動により標本に照射するレーザ光の強度が変動

する。

【0006】

以上のような原因によりレーザー光の強度が変動すると、実際には標本からのシグナル（蛍光）は変化していないにも拘わらず、あたかもシグナルの変化があったような誤った結果が生じる可能性がある。

【0007】

このような事から標本に照射するレーザー光の強度を安定化するための技術として例えば特開平11-231222号公報、特開2000-206415号公報がある。特開平11-231222号公報には、複数の波長のレーザー光を結合した後、そのレーザー光の一部をビームスプリッタにより分割し、次に交換可能なフィルターにより波長を選択し、この選択された波長のレーザー光を光検出器（第一検出エレメント）により受光してその波長のレーザー光の強度を検出し、この検出信号に基づいてレーザー出力又はレーザー強度調整を行う、例えばレーザーと光ファイバーとの間に配置された音響光学素子（例えばAOTF）によりレーザー光の強度を制御することが記載されている。

【0008】

特開2000-206415号公報には、走査モジュールに接続されたレーザー放射を恒常的に監視するために、制御ユニットが駆動した線型フィルタ輪又は領域選択フィルター輪、又はフィルタースライダと組み合わせて動作制御し、これにより選択されたレーザーラインの出力を検出してその検出信号に基づいてAOTFを駆動して、選択されたレーザーラインの出力の安定を図ることが記載されている。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、最近では、細胞や組織の機能探索をさらに深めるために、これら標本から2種類以上のシグナル（蛍光）を同時に検出して、その機能解析を行うことが強く要求されている。例えば、異なる波長の蛍光蛋白、GFP（緑色の蛍光を発する蛋白：GREEN FLUORESCENT PROTEIN）とRFP（赤色の蛍光を発する蛋白：RED FLUORESCENT PROTEIN）とを細胞に遺伝子発現させ、これらの

時間観察を行うことである。

【0010】

この場合、標本に照射するレーザー光は、これら蛍光蛋白 GFP、RFP に最適な波長である必要があり、しかもその2波長のレーザー光はどちらもその光強度が安定していることが必要である。

【0011】

ところが、上記2つの公報に記載されている技術は、一つの波長のレーザー光の強度のみを安定化するためのものであって、同時に2波長以上の波長のレーザー光の強度を安定するように制御することはできない。

【0012】

そこで本発明は、標本に照射する複数の波長からなるレーザー光強度を同時に安定に制御できるレーザー顕微鏡を提供することを目的とする。

【0013】

【課題を解決するための手段】

請求項1記載による本発明は、複数の発振波長からなるレーザー光を対物レンズを通して標本に照射し、この標本からの蛍光を検出するレーザー顕微鏡において、複数の発振波長からなる前記レーザー光をスペクトル分解するスペクトル分解手段と、このスペクトル分解手段によりスペクトル分解されたレーザー光を受光する受光素子列と、この受光素子列の出力信号を受けて前記レーザー光を前記発振波長ごとに制御する制御手段とを具備したことを特徴とするレーザー顕微鏡である。

【0014】

請求項2記載による本発明は、請求項1記載のレーザー顕微鏡において、前記スペクトル分解手段は、プリズム、回折光子、又はビームスプリッタであることを特徴とする。

【0015】

請求項3記載による本発明は、請求項1又は2記載のレーザー顕微鏡において、前記受光素子列は、分割フォトダイオード、又は固体撮像素子であることを特徴とする。

【0016】

請求項 4 記載による本発明は、請求項 1、2 又は 3 記載のレーザ顕微鏡において、複数の発振波長からなる前記レーザ光をレーザ顕微鏡本体に導く光ファイバーを設けたことを特徴とする。

【0017】

請求項 5 記載による本発明は、請求項 4 項記載のレーザ顕微鏡において、前記レーザ光をコリメートするコリメータレンズと、このコリメータレンズによりコリメートされた前記レーザ光の一部を分離するビームスプリッタと、このビームスプリッタにより分離された前記レーザ光をスペクトル分解するスペクトル分解手段と、このスペクトル分解手段によりスペクトル分解されたレーザ光を集光する集光レンズと、この集光レンズにより集光されたレーザ光を受光する受光素子列とを 1 つにブロック化し、レーザ顕微鏡本体に対して着脱自在に構成したことを特徴とする。

【0018】

【発明の実施の形態】

(1) 以下、本発明の第 1 の実施の形態について図面を参照して説明する。

【0019】

図 1 は走査型レーザ顕微鏡の構成図である。支持台 1 上には、アルゴンレーザ 2 が固定されている。このアルゴンレーザ 2 は、波長 $\lambda 1 = 488 \text{ nm}$ と $\lambda 2 = 514.5 \text{ nm}$ との 2 波長のレーザ光を発振するものである。

【0020】

このアルゴンレーザ 2 から発振されるレーザ光の光路上には、レーザ顕微鏡本体を構成する走査ユニット 3 が設けられている。この走査ユニット 3 は、レーザ光を標本 4 に走査するもので、レーザ光の光路上にビームスプリッタ 5 を配置し、このビームスプリッタ 5 の反射光路上に X-Y スキャナ 6 を配置したものとなっている。

【0021】

標本 4 は、例えば GFP と YFP (YELLOW FLUORESCENT PROTEIN) とを遺伝子発現させた細胞である。

【0022】

又、ビームスプリッタ 5 の透過光路（X-Y スキャナ 6 からビームスプリッタ 5 に入射する方向の光路）上には、ミラー 7 を介してダイクロイックミラー 8 とミラー 9 とが直列に配置されている。ダイクロイックミラー 8 は、波長 488 nm と 514.5 nm の 2 波長のレーザ光を標本 4 に照射したときに発する 2 つの波長 λ_1' 、 λ_2' の蛍光を分離するもので、一方の波長 λ_1' の蛍光を反射し、他方の波長 λ_2' の蛍光を透過する性能を有している。このうちダイクロイックミラー 8 の反射光路上には、共焦点レンズ 10 a、共焦点ピンホール 11 a、バンドパスフィルタ 12 a 及び光検出器 13 a が配置され、かつダイクロイックミラー 8 の透過光路上の上記ミラー 9 の反射光路上には、共焦点レンズ 10 b、共焦点ピンホール 11 b、バンドパスフィルタ 12 b 及び光検出器 13 b が配置されている。

【0023】

上記 X-Y スキャナ 6 による走査上には、瞳投影レンズ 14 を介してミラー 15 と観察用プリズム 16 とが設けられている。これらミラー 15 と観察用プリズム 16 とは、切り替え装置 17 によりいずれか一方が光路上に配置されるようになっている。ミラー 15 の反射光路上には、結像レンズ 18 を介して対物レンズ 19 が設けられている。なお、観察用プリズム 16 が光路中に入ると、接眼レンズ 20 を通して標本 4 を目視観察できる。

【0024】

上記走査ユニット 3 内の AOTF 25 からビームスプリッタ 5 までのレーザ光の光路上には、ビームスプリッタ 21 が配置されている。このビームスプリッタ 21 は、波長 $\lambda_1 = 488 \text{ nm}$ と $\lambda_2 = 514.5 \text{ nm}$ との 2 波長のレーザ光の一部を取り出すもので、その取り出し光路上には、プリズム 22 が配置されている。

【0025】

このプリズム 22 は、波長 $\lambda_1 = 488 \text{ nm}$ と $\lambda_2 = 514.5 \text{ nm}$ との 2 波長のレーザ光をスペクトル分解するもので、この場合には波長 $\lambda_1 = 488 \text{ nm}$ と $\lambda_2 = 514.5 \text{ nm}$ との 2 本のレーザ光に分離するものである。

【0026】

このプリズム 2 2 のスペクトル出射方向には、2 分割フォトダイオード 2 3 が配置されている。この 2 分割フォトダイオード 2 3 は、プリズム 2 2 によりスペクトル分解されたレーザ光を受光する受光素子列としての機能を有するもので、その分割面は、スペクトルの分解される方向と同一方向に配置されている。

【 0 0 2 7 】

制御器 2 4 は、2 分割フォトダイオード 2 3 から出力される検出信号を入力し、この検出信号に基づいて波長 $\lambda 1 = 488 \text{ nm}$ と $\lambda 2 = 514.5 \text{ nm}$ との両方のラインの光強度がそれぞれ一定になるように、アルゴンレーザ 2 の出力端に固定された AOTF 2 5 を制御する機能を有している。

【 0 0 2 8 】

この AOTF 2 5 は、制御器 2 4 の制御により、波長 $\lambda 1 = 488 \text{ nm}$ と $\lambda 2 = 514.5 \text{ nm}$ との 2 本の発振波長に対して、波長選択を行うとともに、出射出力を連続的に制御するものとなっている。

【 0 0 2 9 】

次に、上記の如く構成された走査型レーザ顕微鏡の作用について説明する。

【 0 0 3 0 】

アルゴンレーザ 2 から波長 $\lambda 1 = 488 \text{ nm}$ と $\lambda 2 = 514.5 \text{ nm}$ との 2 波長のレーザ光が発振出力されると、このレーザ光は、AOTF 2 5 を通過してビームスプリッタ 2 1 に入射し、その一部が取り出されてプリズム 2 2 に入射する。

【 0 0 3 1 】

このプリズム 2 2 では、波長 $\lambda 1 = 488 \text{ nm}$ と $\lambda 2 = 514.5 \text{ nm}$ との 2 波長のレーザ光がスペクトル分解され、2 分割フォトダイオード 2 3 の分割面に各ラインの 2 本のレーザ光が入射する。

【 0 0 3 2 】

この 2 分割フォトダイオード 2 3 は、プリズム 2 2 によりスペクトル分解されたレーザ光を分割面で受光してその検出信号を出力する。

【 0 0 3 3 】

制御器 2 4 は、2 分割フォトダイオード 2 3 から出力される検出信号を入力し

、この検出信号に基づいて波長 $\lambda_1 = 488\text{ nm}$ と $\lambda_2 = 514.5\text{ nm}$ との両方のラインの光強度がそれぞれ一定になるように、アルゴンレーザ2の出力端に固定されたAOTF25を制御（波長選択制御、振幅制御）する。

【0034】

このとき、アルゴンレーザ2から発振出力される波長 $\lambda_1 = 488\text{ nm}$ と $\lambda_2 = 514.5\text{ nm}$ との2波長のレーザ光のラインに出力変動があると、これらラインの光強度の変動が2分割フォトダイオード23により検出され、制御器24により波長 $\lambda_1 = 488\text{ nm}$ と $\lambda_2 = 514.5\text{ nm}$ との両方のラインの光強度がそれぞれ一定になるようにAOTF25が制御される。

【0035】

このように波長 $\lambda_1 = 488\text{ nm}$ と $\lambda_2 = 514.5\text{ nm}$ との両方のラインの光強度がそれぞれ一定になるように制御されたレーザ光は、ビームスプリッタ5で反射され、X-Yスキャナ6によりX-Y方向に走査される。

【0036】

この走査されたレーザ光は、瞳投影レンズ14を通過し、ミラー15で反射され、結像レンズ18を通過し、対物レンズ19によりスポットを結んで標本4上に走査される。

【0037】

この標本4から発せられる各波長 λ_1' 、 λ_2' の各蛍光は、光路を逆方向に戻り、すなわち対物レンズ19から結像レンズ18、ミラー15、瞳投影レンズ14、X-Yスキャナ6を通り、さらにビームスプリッタ6を透過し、ミラー7で反射してダイクロイックミラー8に入射する。

【0038】

このダイクロイックミラー8は、2つの波長 λ_1' 、 λ_2' の蛍光のうち一方の波長 λ_1' の蛍光を反射し、他方の波長 λ_2' の蛍光を透過する。このうちダイクロイックミラー8で反射した波長 λ_1' の蛍光は、共焦点レンズ10a、共焦点ピンホール11a、バンドパスフィルタ12aを通過して光検出器13aに入射する。

【0039】

これと共にダイクロイックミラー 8 を透過した波長 $\lambda 2'$ の蛍光は、共焦点レンズ 10 b、共焦点ピンホール 11 b、バンドパスフィルタ 12 b を通って光検出器 13 b に入射する。

【0040】

従って、これら光検出器 13 a、13 b から出力される各蛍光強度信号を入力して蓄積し、それぞれ X-Y スキャナ 6 の駆動信号に同期して画像が作像される。

【0041】

このように上記第 1 の実施の形態においては、ビームスプリッタ 21 により波長 $\lambda 1 = 488 \text{ nm}$ と $\lambda 2 = 514.5 \text{ nm}$ との 2 波長のレーザ光の一部を取り出し、プリズム 22 によりこれら波長 $\lambda 1 = 488 \text{ nm}$ と $\lambda 2 = 514.5 \text{ nm}$ との 2 波長のレーザ光をスペクトル分解し、このスペクトル分解された 2 ラインの強度を 2 分割フォトダイオード 23 により検出し、制御器 24 により 2 分割フォトダイオード 23 から出力される検出信号に基づいて波長 $\lambda 1 = 488 \text{ nm}$ と $\lambda 2 = 514.5 \text{ nm}$ との両方のラインの光強度がそれぞれ一定になるように、アルゴンレーザ 2 の出力端に固定された AOTF 25 を制御するので、波長 $\lambda 1 = 488 \text{ nm}$ と $\lambda 2 = 514.5 \text{ nm}$ との両方のラインの光強度を同時にかつ安定して一定に制御でき、例えば標本 4 として GFP と YFP とを遺伝子発現させた細胞の長時間観察を、極めて高い信頼性をもって行うことができる。又、2 分割フォトダイオード 23 を用いるので、安価に構成できる。

【0042】

(2) 次に、本発明の第 2 の実施の形態について図面を参照して説明する。なお、図 1 と同一部分には同一符号を付してその詳しい説明は省略する。

【0043】

図 2 は走査型レーザ顕微鏡の構成図である。ベース 30 には、主に波長 $\lambda 1 = 488 \text{ nm}$ 、 $\lambda 2 = 514.5 \text{ nm}$ 、 $\lambda 3 = 457.9 \text{ nm}$ の 3 波長のレーザ光を発振出力するアルゴンレーザ 31 と、波長 $\lambda 4 = 543 \text{ nm}$ のレーザ光を発振出力するヘリウムネオンレーザ 32 と、波長 $\lambda 5 = 633 \text{ nm}$ のレーザ光を発振出力するヘリウムネオンレーザ 33 とが設けられている。このうちアルゴンレー

ザ 3 1 の出射光路上にはダイクロイックミラー 3 4 が配置され、ヘリウムネオンレーザ 3 2 の出射光路上にはダイクロイックミラー 3 5 が配置され、ヘリウムネオンレーザ 3 3 の出射光路上にはミラー 3 6 が配置され、これらレーザ 3 1、3 2、3 3 からそれぞれ発振出力されるレーザ光は合成されて 1 本のレーザ光になっている。

【 0 0 4 4 】

又、ベース 3 0 における 1 本のレーザ光の出射端には、A O T F 2 5 が固定されている。この A O T F 2 5 は、制御器 2 4 の制御により、波長 $\lambda 1 = 488 \text{ nm}$ 、 $\lambda 2 = 514.5 \text{ nm}$ 、 $\lambda 3 = 457.9 \text{ nm}$ 、 $\lambda 4 = 543 \text{ nm}$ 、 $\lambda 5 = 633 \text{ nm}$ の 5 本の発振波長に対して、任意の組み合わせで波長選択が行えるとともに、出射出力を連続的に制御するものとなっている。

【 0 0 4 5 】

この A O T F 2 5 の出射端には、集光レンズ 3 7 を備えると共に、光ファイバー 3 8 の一端を固定するファイバーカプラ 3 9 が固定されている。なお、光ファイバー 3 8 の一方の光ファイバー端 3 8 a は、ファイバーカプラ 3 9 内の集光レンズ 3 7 の集光位置に位置決めされている。

【 0 0 4 6 】

一方、レーザ顕微鏡本体を構成する走査ユニット 3 には、スペクトルを分解し監視するための 1 つのブロック 4 0 が着脱自在に設けられている。このブロック 4 0 内には、図 3 の拡大構成図に示すように光ファイバー 3 8 の他方の光ファイバー端 3 8 b が挿入・固定され、この光ファイバー端 3 8 b から出射されるレーザ光の光路上にコリメータレンズ 4 1 を介してビームスプリッタ 4 2 が配置されている。このビームスプリッタ 4 2 は、コリメータレンズ 4 1 によりコリメートされたレーザ光の一部を取り出すものである。

【 0 0 4 7 】

このビームスプリッタ 4 2 により取り出されたレーザ光の光路上には、プリズム 4 3 が配置されている。

【 0 0 4 8 】

このプリズム 4 3 は、光ファイバー端 3 8 b から出射されたレーザ光を波長 λ

$\lambda_1 = 488 \text{ nm}$ 、 $\lambda_2 = 514.5 \text{ nm}$ 、 $\lambda_3 = 457.9 \text{ nm}$ 、 $\lambda_4 = 543 \text{ nm}$ 、 $\lambda_5 = 633 \text{ nm}$ の5波長のレーザ光にスペクトル分解するものである。

【0049】

このプリズム43のスペクトル出射方向には、集光レンズ44を介して一次元CCD45が配置されている。この一次元CCD45は、プリズム45によりスペクトル分解されたレーザ光を受光する受光素子列としての機能を有するもので、その分割面は、波長 $\lambda_1 = 488 \text{ nm}$ 、 $\lambda_2 = 514.5 \text{ nm}$ 、 $\lambda_3 = 457.9 \text{ nm}$ 、 $\lambda_4 = 543 \text{ nm}$ 、 $\lambda_5 = 633 \text{ nm}$ の各ラインに対応する5個のブロック面に分割され、これらブロック面ごとに各検出信号を出力するものとなっている。なお、これら検出信号は、各ブロック面ごとに各素子の出力信号の和である。

【0050】

制御器24は、一次元CCD45から出力される各検出信号を入力し、これら検出信号に基づいて波長 $\lambda_1 = 488 \text{ nm}$ 、 $\lambda_2 = 514.5 \text{ nm}$ 、 $\lambda_3 = 457.9 \text{ nm}$ 、 $\lambda_4 = 543 \text{ nm}$ 、 $\lambda_5 = 633 \text{ nm}$ の各ラインの光強度がそれぞれ一定になるように、AOTF25を制御する機能を有している。

【0051】

なお、走査ユニット3には、最大で4種類に蛍光標識された標本4を同時に観察できるように、ダイクロイックミラー8a、8b、8c、共焦点レンズ10a、10b、10c、10d、共焦点ピンホール11a、11b、11c、11d、バンドパスフィルタ12a、12b、12c、12d及び光検出器13a、13b、13c、13dと、ミラー9が設けられている。

【0052】

次に、上記の如く構成された走査型レーザ顕微鏡の作用について説明する。

【0053】

アルゴンレーザ31から波長 $\lambda_1 = 488 \text{ nm}$ 、 $\lambda_2 = 514.5 \text{ nm}$ 、 $\lambda_3 = 457.9 \text{ nm}$ の3波長のレーザ光が発振出力され、ヘリウムネオンレーザ32から波長 $\lambda_4 = 543 \text{ nm}$ のレーザ光が発振出力され、かつヘリウムネオンレーザ33から波長 $\lambda_5 = 633 \text{ nm}$ のレーザ光が発振出力されると、これらレ

ーザ光は、ダイクロイックミラー 3 4、3 5 及びミラー 3 6 により 1 本のレーザー光に合成される。

【0 0 5 4】

この合成されたレーザー光の中で任意組み合わせで選択された波長のレーザー光は、A O T F 2 5 を通過し、集光レンズ 3 7 により集光されて光ファイバー 3 8 の一方の光ファイバー端 3 8 a から入射し、この光ファイバー 3 8 を伝播してブロック 4 0 に挿入された他方の光ファイバー端 3 8 b から出射する。

【0 0 5 5】

この光ファイバー端 3 8 b から出射されたレーザー光は、コリメータレンズ 4 1 によりコリメートされ、ビームスプリッタ 4 2 によりその一部が取り出されてプリズム 4 3 に入射する。

【0 0 5 6】

このプリズム 4 3 では、光ファイバー端 3 8 b から出射されたレーザー光が波長 $\lambda 1 = 488 \text{ nm}$ 、 $\lambda 2 = 514.5 \text{ nm}$ 、 $\lambda 3 = 457.9 \text{ nm}$ 、 $\lambda 4 = 543 \text{ nm}$ 、 $\lambda 5 = 633 \text{ nm}$ の 5 波長のレーザー光がスペクトル分解され、これら $\lambda 1 = 488 \text{ nm}$ 、 $\lambda 2 = 514.5 \text{ nm}$ 、 $\lambda 3 = 457.9 \text{ nm}$ 、 $\lambda 4 = 543 \text{ nm}$ 、 $\lambda 5 = 633 \text{ nm}$ の各ラインが一次元 C C D 4 5 の 5 個のブロック面に入射する。

【0 0 5 7】

この一次元 C C D 4 5 は、プリズム 4 5 によりスペクトル分解されたレーザー光を受光し、そのブロック面ごとに各検出信号を出力する。

【0 0 5 8】

制御器 2 4 は、一次元 C C D 4 5 から出力される各検出信号を入力し、これら検出信号に基づいて波長 $\lambda 1 = 488 \text{ nm}$ 、 $\lambda 2 = 514.5 \text{ nm}$ 、 $\lambda 3 = 457.9 \text{ nm}$ 、 $\lambda 4 = 543 \text{ nm}$ 、 $\lambda 5 = 633 \text{ nm}$ の各ラインの光強度がそれぞれ一定になるように、A O T F 2 5 を制御する。

【0 0 5 9】

このとき、波長 $\lambda 1 = 488 \text{ nm}$ 、 $\lambda 2 = 514.5 \text{ nm}$ 、 $\lambda 3 = 457.9 \text{ nm}$ 、 $\lambda 4 = 543 \text{ nm}$ 、 $\lambda 5 = 633 \text{ nm}$ のラインの中で任意の組み合わせで

発振された波長のレーザ光に出力変動があると、これらラインの光強度の変動が一次元CCD45により検出され、制御器24により $\lambda 1 = 488 \text{ nm}$ 、 $\lambda 2 = 514.5 \text{ nm}$ 、 $\lambda 3 = 457.9 \text{ nm}$ 、 $\lambda 4 = 543 \text{ nm}$ 、 $\lambda 5 = 633 \text{ nm}$ の中で選択された各ラインの光強度がそれぞれ一定になるようにAOTF25が制御される。

【0060】

このように各波長のラインの光強度がそれぞれ一定になるように制御されたレーザ光は、ビームスプリッタ5で反射し、X-Yスキャナ6によりX-Y方向に走査される。

【0061】

この走査されたレーザ光は、瞳投影レンズ14を通過し、ミラー15で反射され、結像レンズ18を通過し、対物レンズ19によりスポットを結んで標本4上に走査される。

【0062】

この標本4から発せられる各蛍光は、光路を逆方向に戻り、すなわち対物レンズ19から結像レンズ18、ミラー15、瞳投影レンズ14、X-Yスキャナ6を通り、さらにビームスプリッタ5を透過し、ミラー7で反射してダイクロイックミラー8a以後の光検出器13a、13b、13c、13dに入射し、これら光検出器から出力される各蛍光強度信号を入力して蓄積し、それぞれX-Yスキャナ6の駆動信号に同期して画像を形成し、最大4種類に蛍光標識した標本15の蛍光画像が作像される。

【0063】

このように上記第2の実施の形態においては、ビームスプリッタ42により波長 $\lambda 1 = 488 \text{ nm}$ 、 $\lambda 2 = 514.5 \text{ nm}$ 、 $\lambda 3 = 457.9 \text{ nm}$ 、 $\lambda 4 = 543 \text{ nm}$ 、 $\lambda 5 = 633 \text{ nm}$ の5波長のレーザ光の中で、任意の組み合わせで選択された波長のレーザ光の一部を取り出し、プリズム43によりこれら波長のレーザ光をスペクトル分解し、このスペクトル分解された各ラインの強度を一次元CCD45により検出し、制御器24により一次元CCD45から出力される各検出信号に基づいて各ラインの光強度がそれぞれ一定になるように、AOTF2

5を制御するので、波長 $\lambda_1 = 488\text{ nm}$ 、 $\lambda_2 = 514.5\text{ nm}$ 、 $\lambda_3 = 457.9\text{ nm}$ 、 $\lambda_4 = 543\text{ nm}$ 、 $\lambda_5 = 633\text{ nm}$ の5ラインの光強度を同時にかつ安定して一定に制御でき、標本4を遺伝子発現させた細胞の長時間観察を、極めて高い信頼性をもって行うことができる。又、一次元CCD45を用いたので、複数のレーザラインに対応でき、自由度の高い設計が可能となる。

【0064】

さらに、コリメータレンズ41、ビームスプリッタ42、プリズム43、集光レンズ44及び一次元CCD45を1つのブロック40として構成したので、例えば倒立型の顕微鏡本体に走査ユニット3が接続されている走査型レーザ顕微鏡がもう一台ある場合、使用目的によって、これら正立型、倒立型を使い分けたいときに、レーザ光源及び各ラインの光強度を検出するCCDを含むブロックを共通に使用でき、安価にすることができる。

【0065】

なお、本発明は、上記第1及び第2の実施の形態に限定されるものでなく、実施段階ではその要旨を逸脱しない範囲で種々に変形することが可能である。

【0066】

さらに、上記実施形態には、種々の段階の発明が含まれており、開示されている複数の構成要件における適宜な組み合わせにより種々の発明が抽出できる。例えば、実施形態に示されている全構成要件から幾つかの構成要件が削除されても、発明が解決しようとする課題の欄で述べた課題が解決でき、発明の効果の欄で述べられている効果が得られる場合には、この構成要件が削除された構成が発明として抽出できる。

【0067】

例えば、上記第1及び第2の実施の形態におけるスペクトル分解手段としては、プリズム22、43に限らず、回折光子、又はビームスプリッタを用いてもよい。

【0068】

【発明の効果】

以上詳記したように本発明によれば、標本に照射する複数の波長からなるレー

ザ光強度を同時に安定に制御できるレーザ顕微鏡を提供できる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明に係わる走査型レーザ顕微鏡の第 1 の実施の形態を示す構成図。

【図 2】

本発明に係わる走査型レーザ顕微鏡の第 2 の実施の形態を示す構成図。

【図 3】

本発明に係わる走査型レーザ顕微鏡の第 2 の実施の形態におけるブロック内の拡大構成図。

【符号の説明】

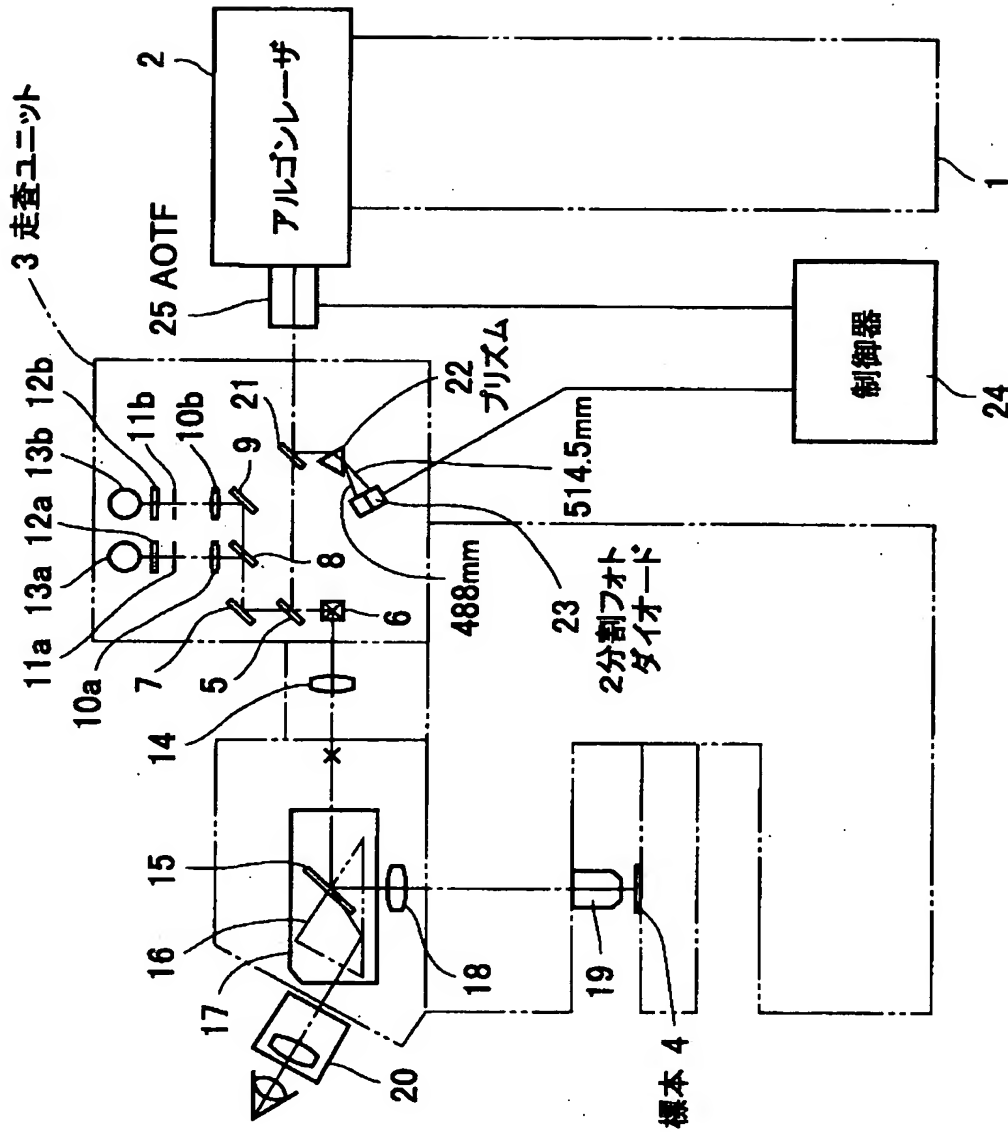
- 1 : 支持台
- 2 : アルゴンレーザ
- 3 : 走査ユニット
- 4 : 標本
- 5 : ビームスプリッタ
- 6 : X-Y スキャナ
- 7 : ミラー
- 8 : ダイクロイックミラー
- 9 : ミラー
- 10 a, 10 b : 共焦点レンズ
- 11 a, 11 b : 共焦点ピンホール
- 12 a, 12 b : バンドパスフィルタ
- 13 a, 13 b : 光検出器
- 14 : 瞳投影レンズ
- 15 : ミラー
- 16 : 観察用プリズム
- 17 : 切り替え装置
- 18 : 結像レンズ
- 19 : 対物レンズ

- 2 0 : 接眼レンズ
- 2 1 : ビームスプリッタ
- 2 2 : プリズム
- 2 3 : 2分割フォトダイオード
- 2 4 : 制御器
- 2 5 : A O T F
- 3 0 : ベース
- 3 1 : アルゴンレーザ
- 3 2 , 3 3 : ヘリウムネオンレーザ
- 3 4 , 3 5 : ダイクロイックミラー
- 3 6 : ミラー
- 3 7 : 集光レンズ
- 3 8 : 光ファイバー
- 3 9 : ファイバーカプラ
- 4 0 : ブロック
- 4 1 : コリメータレンズ
- 4 2 : ビームスプリッタ
- 4 3 : プリズム
- 4 4 : 集光レンズ
- 4 5 : 一次元C C D

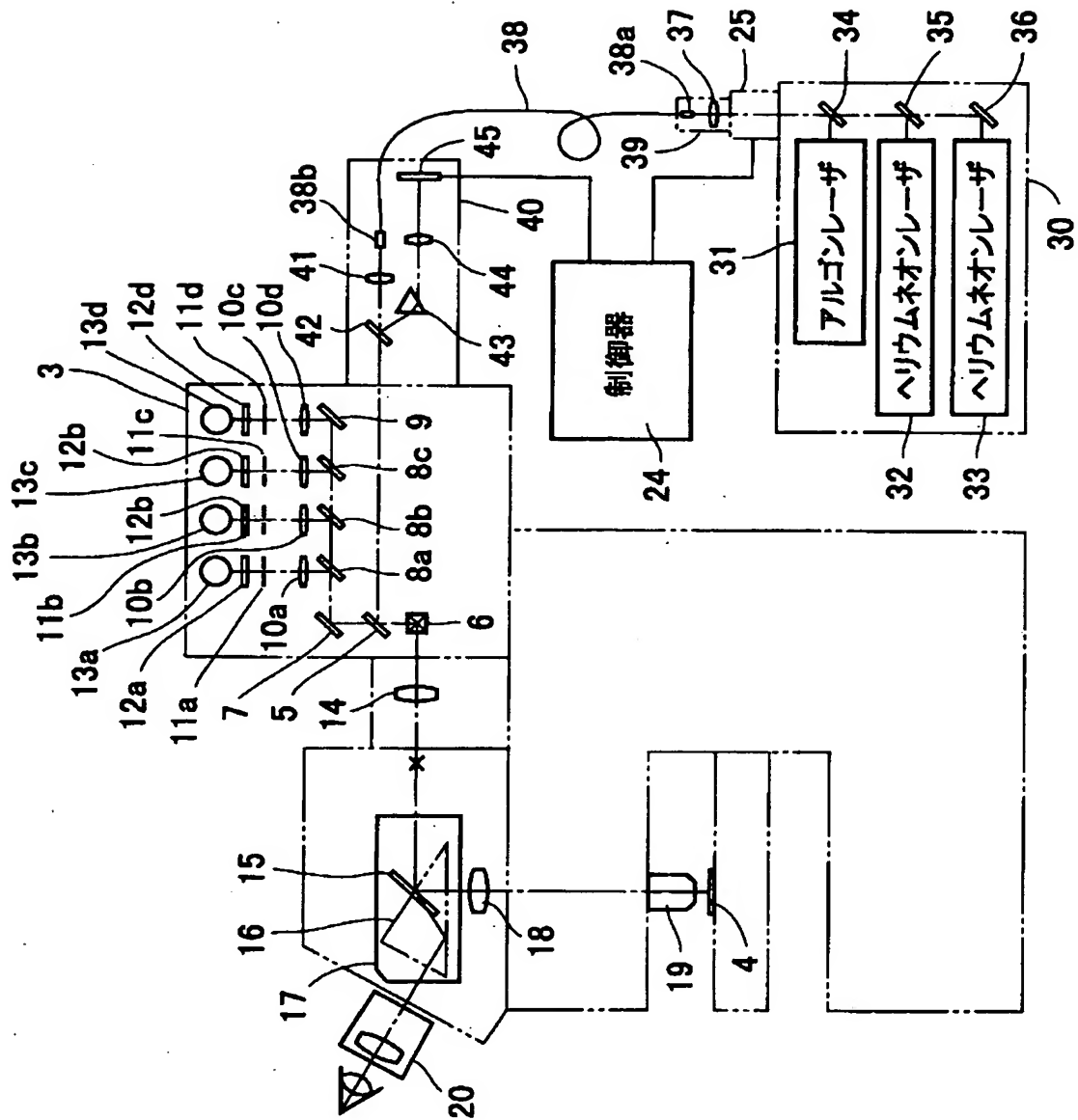
【書類名】

図面

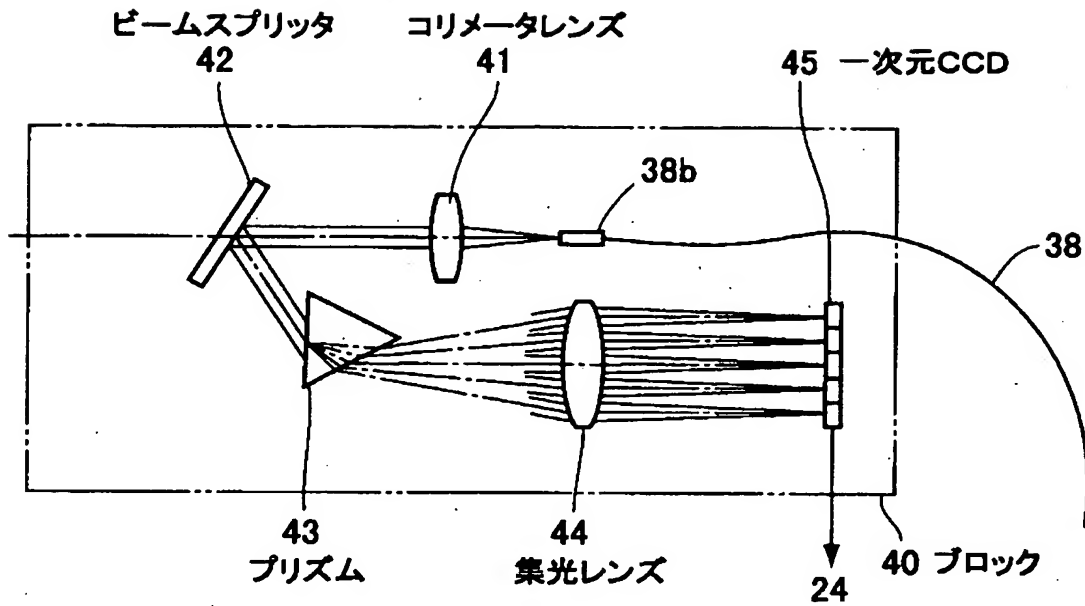
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 標本に照射する複数の波長のレーザー光強度を同時に安定に制御する。

【解決手段】 ビームスプリッタ 2 1 により波長 $\lambda 1 = 488 \text{ nm}$ と $\lambda 2 = 514.5 \text{ nm}$ との 2 波長のレーザー光の一部を取り出し、プリズム 2 2 によりこれら波長 $\lambda 1 = 488 \text{ nm}$ と $\lambda 2 = 514.5 \text{ nm}$ との 2 波長のレーザー光をスペクトル分解し、このスペクトル分解された 2 ラインの強度を 2 分割フォトダイオード 2 3 により検出し、制御器 2 4 により 2 分割フォトダイオード 2 3 から出力される検出信号に基づいて波長 $\lambda 1 = 488 \text{ nm}$ と $\lambda 2 = 514.5 \text{ nm}$ との両方のラインの光強度がそれぞれ一定になるように、アルゴンレーザー 2 の出力端に固定された AOTF 2 5 を制御する。

【選択図】 図 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000376]

| | |
|----------|-------------------|
| 1. 変更年月日 | 1990年 8月20日 |
| [変更理由] | 新規登録 |
| 住 所 | 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 |
| 氏 名 | オリンパス光学工業株式会社 |